

# 质谱和动力学技术研究胰岛素-多糖纳米粒稳定性和释放胰岛素速率

黄河宁<sup>1\*</sup>, 谢 麟<sup>1</sup>, 易瑞炷<sup>3</sup>, 方雪萍<sup>1</sup>, 黄河清<sup>1,2\*\*</sup>

(1. 厦门大学生命科学学院 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室,

2. 厦门大学化学化工学院 固体表面物理化学国家重点实验室, 福建 厦门 361005;

3. 国家海洋局第三海洋研究所, 福建 厦门 361005)

**摘要:** 以海藻酸钠(sodium alginate, SA)和壳聚糖(chitosan, CS)为纳米粒包被材料, 构建胰岛素(insulin, INS)多糖纳米粒. 采用基质辅助激光解吸电离飞行时间(Matrix-assisted laser desorption ionization/time of flight, MALDI-TOF)质谱技术研究若干化学因素影响 INS-多糖纳米粒的稳定性. 选用电子光谱技术研究 INS-多糖纳米粒控释 INS 速率及动力学特性. 实验结果表明, INS-SA 纳米粒在 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.2)和醋酸介质中均呈不稳定状态, 易释放 INS; 而 INS-CS 纳米粒在 Tris-HCl 缓冲液中呈较为稳定状态, 其释放 INS 速率明显慢于 INS-SA 纳米粒, 并遵循一级反应动力学过程. INS-SA 和 INS-CS 纳米粒均能有控制 INS 释放速率能力, 但两者释放速率明显不同, 其速率可分为快速与慢速释放方式. CS 比 SA 更适合于作为包被材料研制 INS-多糖纳米粒口服制剂.

**关键词:** 质谱; 释放胰岛素动力学; 稳定性; 多糖纳米粒; 传输

中图分类号: Q 51

文献标识码: A

文章编号: 0438-0479(2007)05-0697-05

纳米科技的迅速发展推动药物运输系统和疾病诊断研究不断地深入和延伸, 纳米粒和纳米胶囊是实现多肽药物直接口服给药途径中最有发展前景的技术之一<sup>[1]</sup>. 由于纳米粒的特点和包被材料特殊性质, 使多肽纳米粒口服药物不仅可以避免或减少多肽药物在胃肠中受酸碱、酶和有机化合物等不利因素的分解而失效, 而且还具备自由地穿梭于胃肠道的物理屏障的能力, 起到抵达药物作用靶、提高药物利用率和大大降低药物副作用的效果<sup>[2-3]</sup>.

目前, 纳米粒的包被材料种类较多, 高分子多糖作为多肽药物的纳米包被材料, 具有低毒性、高生物相容性和较好的控释能力等优点, 是一种较为理想的纳米包被材料<sup>[4-7]</sup>. INS 是糖尿病患者维持正常血糖水平的首选多肽药品, 注射给药是 INS 供药唯一有效途径, 但却给用药患者带来不便和痛苦. 目前普遍采用动态监测实验动物血糖水平的分析方法难于直接快速反映出胃肠中 INS 利用率、控释、稳定性和分解过程, 使优化研制 INS 纳米粒材料受到限制. 拓展具有快速、简单和高灵敏度地分析 INS 及分解产物技术, 并适合

于监测 INS 纳米粒稳定性、控释 INS 速率和科学地评价 INS 利用率是目前研制多肽口服药物亟待解决的关键性问题之一.

MALDI-TOF 质谱技术是一种新兴的软离子技术<sup>[8-10]</sup>, 适合于分析多肽、蛋白质、酶、核酸和其他高分子化合物, 其灵敏度可高达飞摩尔级, 有高重复性, 而且不会产生内源性分子碎片峰, 是目前从事生物大分子组成与结构分析方法中最有效手段之一. 本文以 MALDI-TOF 质谱和电子光谱技术为非在线联合分析手段, 研究若干化学因素影响 INS-SA 和 INS-CS 纳米粒的稳定性和控制 INS 速率的动力学特性; 其技术可为今后优化研制多肽纳米粒口服制剂的生物利用率提供新颖分析技术, 具有重要科学意义和应用价值.

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂与设备

MALDI-TOF 质谱仪(Bruker 公司产品, 型号: Reflex III(UPTM))配置脉冲氮激光(337 nm)作为离子解吸电离源. 透析袋(截留分子量 10 000 u). 质谱测定所需的基质 2, 5-二羟苯基甲酸(DHB)、2-氰基-4-羟基肉桂酸(HCCA)、芥子酸(Sinapic Acid, SAD)均为质谱纯, 购自美国 ICN 生物医学公司; 三氟乙酸、乙腈为光谱纯(Sigma 公司); INS(徐州万邦生化制药有限公司, 40U)、SA、CS 和氯化钙(中国医药公司北京采

收稿日期: 2006-12-20

基金项目: 国家自然科学基金(30470372), 三明市科技项目(2004

I-1)资助

\* 厦门大学访问学者, 现在三明学院化学与生物工程系工作

\*\* 通讯作者: hqhuang@xmu.edu.cn

购供应站经销)、多聚磷酸钠(广东汕头市西陇化工厂)均为分析纯。

## 1.2 方法

### (1) INS-SA 纳米粒的制备

配制 0.1% 的 SA 溶液, 加入一定量 INS 溶液, 在磁力搅拌的条件下, 加入一定量的 0.2% 氯化钙溶液, 继续搅拌 30 min, 然后静置过夜, 即可得到 INS-SA 纳米粒悬浮液<sup>[11]</sup>。

(2) INS-CS 纳米粒制备取一定量 CS 溶于 1% 醋酸溶液, 加入一定量的 INS 溶液, 在磁力搅拌的条件下, 加入一定量的 0.1% 多聚磷酸钠溶液, 继续搅拌一段时间, 即可获得 INS-CS 纳米粒悬浮液。

### (3) 透析 INS-多糖纳米粒悬浮液

取适量 INS 纳米粒悬浮液装入透析袋中, 并置于 0.01 mol/L 的 HCl 溶液中, 恒温振荡 (37℃, 150 r/min) 透析 30 min 至游离的 INS 完全被透析到溶液中, 收集 INS-多糖纳米粒。

### (4) INS-多糖纳米粒分离与纯化

将制备好的 INS-SA 和 INS-CS 纳米粒的溶液分别以 38 000 r/min 离心力离心 30 min (4℃), 随后收集沉淀物, 弃上清液。收集 INS-多糖纳米粒, 并置于 Sephadex G-75 层析柱 (1.5 × 6.0 cm) 上进一步分离纯化, 去除游离的有机化合物、杂多糖等。INS-多糖纳米粒的 INS 包封率约为 85% ~ 90%。实验所需的 INS-多糖纳米粒纯度将经反相高压液相色谱仪 (C<sub>18</sub> 层析柱) 给予鉴定。

### (5) INS-多糖纳米粒中 INS 稳定性的分析

目前, 多数文献报道均采用 PBS 缓冲液作为 INS 纳米粒释放的体系。本试验则采用 0.02 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.0) 和醋酸作为释放介质, 研究 INS-多糖纳米粒在弱酸及中性介质中 INS 稳定性; 了解缓冲液等有机组分影响 INS-多糖纳米粒控释 INS 速率及动力学特性。选用电子光谱技术研究 INS-多糖纳米粒控释 INS 的动力学过程和规律。采用高灵敏度紫外分光光度计直接监测 INS-多糖纳米粒释放 INS 全过程, 监测波长为 280 nm。

### (6) 基质和质谱测试样品配制

0.1% 的三氟乙酸 (TFA) 水溶液和 30% 的乙腈 (ACN) 按 7:1 体积比混合成溶液。根据试验要求加入一定量的基质于混合溶液中, 超声波处理 5 min, 并离心 (5 000 g) 5 min, 收集上清液, 即为饱和基质溶液。样品和饱和基质溶液按 1:1 体积比混合后, 取 0.8 μL 混合物直接点滴在 MALDI-TOF 质谱仪专用样品靶上, 待样品自然干燥后, 将样品靶直接放入质谱仪的靶箱内, 进行样品分析<sup>[8-10]</sup>。

## 2 结果和讨论

### 2.1 质谱分析 INS-SA 纳米粒稳定性及 INS 分解产物

海藻酸由 β-1, 4-D 糖苷醛酸和 α-1, 4-L 古洛糖醛组成的杂多糖, 它已较为广泛地被用于药物的控释材料及蛋白质固定剂。近期研究已经证实, 由 SA 和 CS 包被的 INS 纳米粒经分离与纯化后, 其纳米粒中的 INS 无法呈现特征的质谱峰; 即在酸性基质作用下, 来源于 MALDI-TOF 质谱仪的激光强度, 也无法直接使 INS-多糖纳米粒释放 INS, 并供于质谱分析<sup>[12]</sup>。通常 INS 表现出三个特征质谱峰, 其中峰位  $m/z$  位于 5 780.23, 2 887.46 和 3 362.55 处, 分别是带单电荷的 INS、带双电荷 INS 和 INS 的 B 链修饰物<sup>[12]</sup>。本实验在分析前, 将已合成的 INS-SA 纳米粒经 Sephadex G-75 层析柱纯化, 随后再采用 HPLC 进一步验证其 INS-SA 纳米粒纯度 (图 1)。从图示中的色谱图可获悉, 用于研究的 INS-SA 纳米粒样品具有较高纯度和含有微量杂质, 符合于采用 MALDI-TOF 质谱技术研究 INS 及它的分解产物基本要求。把经纯化后的 INS-SA 纳米粒置于 Tris-HCl (pH 7.2) 缓冲液中 30 min 后, 并采用 MALDI-TOF 质谱技术测定 INS 和它的分解产物, 可获得图 2 结果。从图 2 结果可看出, INS-SA 纳米粒在 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.2) 呈不稳定状态, 易快速释放 INS ( $m/z$  5 780); 释放后的 INS 可能受缓冲液有机组成 (Tris) 的影响, 导致它在基质辅助和激光解吸 INS 成为分子离子过程中, 使部分 INS 分解成各种多肽产物 (见图 2) 或者由受缓冲液有机组成 (Tris) 直接影响而分解 INS。INS 在 pH 2.0~3.5 介质中呈稳定状态, 没有发生水解或 A 链和 B 链之间的断裂等现象, 已经获得实验验证<sup>[12]</sup>。这说明 INS 直接口

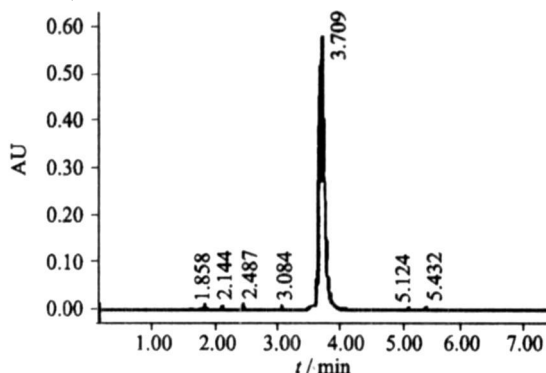


图 1 经反相高压液相色谱分离后, INS-SA 纳米粒的色谱图

Fig. 1 Chromatogram of INS-SA nanoparticles separated with RE-HPLC

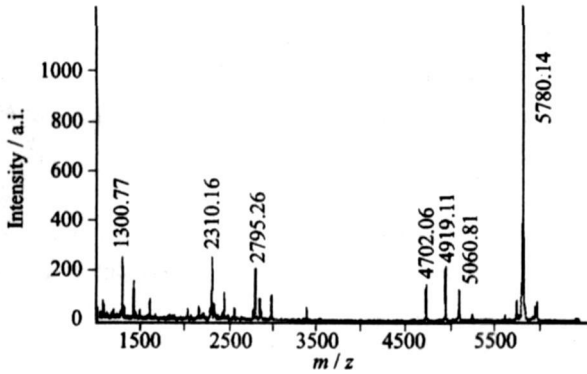


图 2 INS-SA 纳米粒在 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.2) 中的质谱图

Fig. 2 Mass spectrogram of INS-SA nanoparticles in the Tris-HCl buffer (pH 7.2)

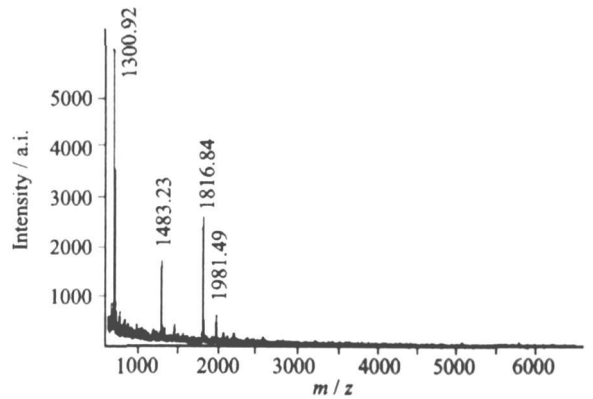


图 3 经弱碱 (0.1 mol/L) 处理后, INS-SA 纳米粒在 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.2) 中的质谱图

Fig. 3 Mass spectrogram of INS-SA nanoparticles in the Tris-HCl buffer (pH 7.2) after treated with weak basic medium (0.1 mol/L NaOH)

服生物利用率很低的主要起因不是 INS 在受患者胃酸的影响而失效, 可能受简单有机化合物的影响. 但弱酸性介质下, 较高浓度  $\text{OH}^-$ ,  $-\text{COO}^-$  和  $\text{NH}_4^+$  通过削弱 *L-R* 酰胺键键能, 加速 INS 水解和降解. 因而 INS 在 Tris-HCl 介质 (pH 7.2) 下, 呈不稳定状态, 易被降解成短肽产物 (图 2). 为了进一步证实上述论点的可信度和合理性, 作者对 INS-SA 纳米粒先进行稀碱液处理 (0.1 mol/L, 30 min) 后, 再转入 Tris-HCl 介质 (pH 7.2) 中. 实验结果 (图 3) 表明, 从 INS-SA 纳米粒中释放出的 INS 部分被分解成无活性的短肽. 如何简单快速地合理地测定 INS 纳米粒包被材料控释 INS 释放速率, 是目前优化构建包被材料和提高 INS 口服制剂生物利用度的难题之一. 在现有研究基础上, 作者采用电子光谱技术研究 INS-SA 和 INS-CS 纳米粒控释 INS 的能力与速率, 可为筛选 INS 或其他多肽药物成多肽纳米粒药物的最佳包被材料提供快速简便的可行性鉴定技术.

## 2.2 INS-SA 纳米粒释放 INS 过程和动力学特性

图 4 是在 Tris-HCl (pH 7.2) 介质条件下, INS-SA 纳米粒释放 INS 动力学全过程, 释放时间约为 96.0 h. 从图中可清楚看出, INS-SA 纳米粒以不同速率方式释放纳米粒中的 INS, 并可分为快速 (图 4A) 和慢速 (图 4B) 释放阶段, 其中在 3 h 内释放约为占 63% INS 方式 (图 4A) 称为快速释放阶段; 而释放其余的 INS 量却需要约为 95 h, 可称为慢速释放阶段. 释放速率和方式可能与构成 INS 纳米粒的包被材料 SA 组成有关. 为了证实这一论点, 作者选用醋酸为反应介质, 研究 INS-SA 纳米粒释放 INS 动力学全过程. 图 5 是在醋酸介质条件下, INS-SA 纳米粒释放 INS 全过程. 比较图 4~5 结果, 同样能直观地看出, INS-SA 纳米

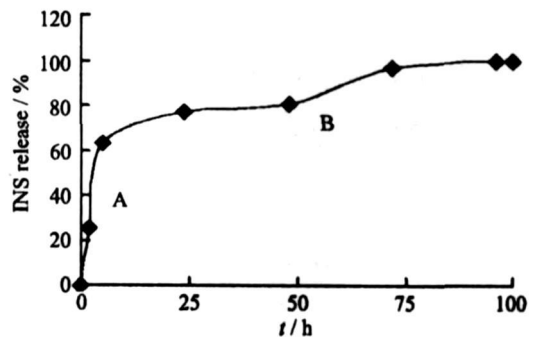


图 4 在 Tris-HCl 缓冲液 (pH 7.2) 条件下, INS-SA 纳米粒释放 INS 全过程

Fig. 4 A complete process of INS release from the INS-SA nanoparticles in the Tris-HCl buffer (pH 7.2)

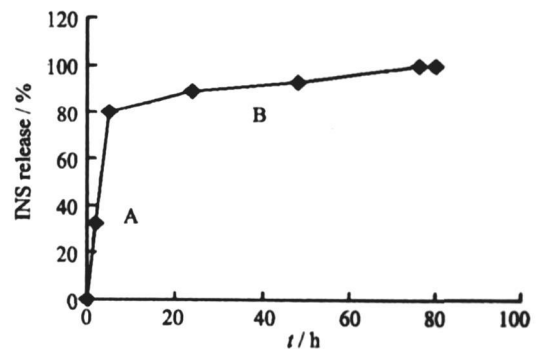


图 5 在醋酸条件下, INS-SA 纳米粒释放 INS 全过程

Fig. 5 A complete process of INS release from the INS-SA nanoparticles in acetic acids (pH 4.0)

粒以两种不同的速率释放 INS, 其释放过程和趋势与图 4 结果很类似. 从图 5 中可看出, INS-SA 纳米粒在醋酸介质中比在 Tris-HCl 缓冲液中更不稳定, 在反应时间为 3 h 内, INS-SA 纳米粒已释放 80% 的 INS, 属于快速释放阶段 (图 5A); 而释放剩余 20% 的 INS 至

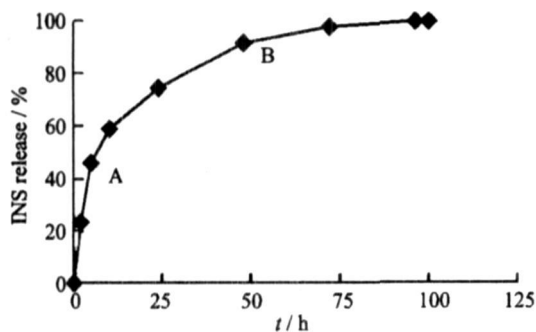


图6 在 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.2)条件下, INS-CS 纳米粒释放 INS 全过程

Fig. 6 A complete process of INS release from the INS-CS nanoparticles in the Tris-HCl buffer(pH 7.2)

少需要 93 h 以上, 属于慢速释放阶段(图 4B). 进一步分析图 3~4 结果和 INS 释放速率, 作者认为 INS-SA 纳米粒在弱酸碱和有机化合物介质中稳定性比较差, 尤其控释 INS 速率, 不太适合作为 INS 或其他多肽药物的口服制剂纳米粒包被材料.

### 2.3 INS-CS 纳米粒释放 INS 过程和动力学特性

CS 属于碱性多糖, 具有无毒、来源丰富、有良好的生物相容性及生物可降解性等特点. 近年来, CS 在药物控释、缓释、靶向智能释放等研究领域已经引起极大关注和重视<sup>[5-6]</sup>. 图 6 是 INS-CS 纳米粒在 Tris-HCl(pH 7.2) 条件下释放 INS 全过程. 比较图 3 结果可获悉, INS-CS 纳米粒释放 INS 速率明显慢于 INS-SA 纳米粒, 同样可以分为快速释放阶段(图 6A)和慢速释放阶段(图 6B). 比较图 4 结果, 作者发现 INS-CS 纳米粒释放占总量 INS 的 63% 时, 所需要的反应时间约为 20 h(图 6A), 而释放其余的 INS 所需要的时间约为 76 h(图 6B), 具备可控释和缓释 INS 的能力. 如以释放 INS 释放量为自然对数对反应时间作图可获得线性对应关系, 即认为 INS-CS 纳米粒以一级反应动力学方式释放 INS, 它与具有控释能力的铁蛋白和转铁蛋白释放铁的动力学规律和特性很相似<sup>[13-14]</sup>, 具有通过蛋白质结构或构象调节方式控释铁速率的趋势. 参比图 4~6 实验结果, 作者认为选用 CS 作为 INS 纳米粒包被材料要比 SA 显示更多优势, 至少在控释和耐有机化合物解离方面, 潜在着可作为 INS 口服制剂的可能. 本论文所拓展质谱和动力学非在线联用分析技术, 不仅仅适合于优化筛选研制 INS 口服制剂的控释包被材料, 而且适合于研究其他各类多肽药物稳定性、控释能力和优化筛选包被材料.

### 参考文献:

- [1] Pan Y, Li Y J, Zheng J M, et al. Bioadhesive polysaccharide in protein delivery system: chitosan nanoparticles improve the intestinal absorption of insulin in vivo[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2002, 249: 139-147.
- [2] Majeti N V, Ravi K. A review of chitin and chitosan application[J]. Reactive & Functional Polymers, 2000, 46: 1-27.
- [3] 董岸杰, 邓联东. 可降解聚合物纳米胶囊型药物载体及组合胶囊的药物控制释放[J]. 中国医学工程. 2005, 13: 128-131.
- [4] Campos A M, Sanchez A, Alonso M. Chitosan nanoparticles a new vehicle for the important of the delivery drugs to the ocular surface: application to cyclosporine A[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2001, 224: 159-168.
- [5] Lubben I M, Verhoef J C, Borchard G, et al. Chitosan for mucosal vaccination[J]. Advanced Drug Delivery, 2001, 52: 139-144.
- [6] Illum L, Gill I J, Hinchcliffe M. et al. Chitosan as novel nasal delivery system for vaccines[J]. Advanced Drug Delivery, 2001, 51: 81-96.
- [7] Schnurch A B. Chitosan and its derivatives: potential excipients for peptidic peptide delivery systems[J]. International Journal of Pharmaceutics, 2000, 194: 1-13.
- [8] Huang H Q, Xiao Z Q, Chen X, et al. Characteristics of structure, composition, mass spectra, and iron release from shayk liver (Sphyrna zygaena) [J]. Biophysical Chemistry, 2004, 111: 213-222.
- [9] 黄河宁, 胡晓慧, 黄河清, 等. 质谱技术研究儿茶素及儿茶素-锆多聚体特性[J]. 分析化学, 2006, 34(1): 52-56.
- [10] 颜利, 黄河清, 金宏伟, 等. M ALDI-TOF 质谱技术和电子光谱技术研究人体血清铁蛋白释放铁的动力学研究[J]. 高等学校化学学报, 2004, 25: 1889-1892.
- [11] 袁弘, 胡富强, 应晓英, 等. 胰岛素纳米粒的制备[J]. 中国药学杂志, 2002, 37(5): 349-352.
- [12] 曾新华, 谢麟, 卓慧钦, 等. M ALDI-TOF 质谱技术研究胰岛素海藻酸钠纳米粒特性[J]. 海洋科学, 2006, 30(1): 73-77.
- [13] Huang H Q, Xiao Z Q, Lin Q M, et al. Characteristics of trapping various organophosphorus pesticides with a ferritin reactor of shark liver(Sphyrna zygaena)[J]. Analytical Chemistry, 2005, 77: 1920-1927.
- [14] Halbrooks P J, He Q Y, Briggs S K. Investigation of the mechanism of iron release from the G lobe of human serum transferrin: Mutational analysis of the role a pH sensitive triad[J]. Biochemistry, 2003, 42: 3701-3707.

# Stability and Rate of Insulin Release from the Insulin-Polysaccharide Nanoparticles Measured with a Combine Off-line Technology Both Mass Spectrometry and Kinetics

HUANG He-ning<sup>1\*</sup>, XIE Lin<sup>1</sup>, YI Ru-zao<sup>3</sup>,

FANG Xue-ping<sup>1</sup>, HUANG He-qing<sup>1,2\*\*</sup>

(1. Key Laboratory of MOE for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University,

2. State Key Laboratory of Physical Chemistry of Solid Surface, College of Chemistry and Chemical Engineering,

Xiamen University, Xiamen 361005, China;

3. Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** Sodium alginate (SA) and chitosan (CS) as encapsulated materials were used to encapsulate into the polysaccharide nanoparticle of insulin. The stability of these nanoparticles effected with several chemical factors was further studied by matrix-assisted laser desorption ionization/time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). Moreover, the rate of controlled release insulin (INS) and its kinetic characteristics from the SA-nanoparticles of INS were measured with electronic spectral technology. The experimental results indicated that SA-nanoparticles of INS showed unstable characteristics under the condition of both Tris-HCl buffer (pH 7.2) and acetic acids, respectively, because of insulin release easily. Contrarily, INS within the polysaccharide nanoparticle of CS was suggested to be stability due to rate of insulin release in later was much lower than that in front. It is indicated that this kinetic pathway followed first-order reaction. Even so, both INS-SA and INS-CS nanoparticles had still capacities for controlling the rate, but both rates went along different evidently, which can be divided into quick and slow approaches. Here, we indicated that CS rather than SA as encapsulated materials is suit for preparing oral drug of INS encapsulated with polysaccharide nanoparticle.

**Key words:** mass spectrometry; kinetics of insulin release; stability; polysaccharide nanoparticles; delivery